

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500
Publication date: 1988-05-24
Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03
Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD
Requested Patent: JP63119500
Application Number: JP19870125443 19870522
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04
EC Classification:
Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL:A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98; N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = -37+$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm^{-1} ; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE:A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION:For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $\geq 15 \times 10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

③ 日本国特許庁(JP)

④ 特許出願公開

⑤ 公開特許公報(A)

昭63-119500

⑥ Int. Cl.

⑦ 特許庁

⑧ 庁内整理番号

⑨ 公開 昭和63年(1988)5月24日

C 07 K 15/14
A 61 K 31/723ABL
ABY

8318-4H

7252-4C ※ 等価請求 未請求 発明の数 5 (全13頁)

⑩ 発明の名称 抗酸化多量体DS 4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

⑪ 特 願 昭62-125443

⑫ 出 願 昭62(1987)5月22日

⑬ 優先権主張 ⑭ 昭61(1986)5月23日 ⑮ 日本(JP) ⑯ 特願 昭61-118847

⑰ 発 明 者 井 上 和 彦 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑱ 発 明 者 田 中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑲ 発 明 者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑳ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

\textcircled{21} 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名
最終頁に続く

明 細 書

ガラクトース基連)

1. 発明の名称

蛋白含量(%) : 1 ± 0.5 (ローリー・フォ

抗酸化多量体DS 4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

リン法、牛血清アルブミン標準)

2. 特許請求の範囲

(4) 比較元質

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質を有する抗酸化多量体DS 4152。

 $(\alpha)_D^{20} -37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)

(ii) 分子量(ゲルろ過法による)

(5) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

1240, 840(肩), 810(cm^{-1} ; KBr)22000 \pm 3000

(6) 溶解性

(iii) 元素分析値

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、ノタノール、エタノール等の有機溶媒

C 24.42~25.76% H 3.34~3.96%

には殆ど不溶。

N 0.51~0.89% S 10.6~11.7%

P 0.77~1.06%

(7) 着色反応

(iv) 糖および蛋白質の含量

フェノール-硫酸、アンスロン-硫酸、ビ

糖含量(%) : 57 ± 3 (フェノール-硫酸法、

ムレフト反応およびローリー・フォリン反応

は陽性。水溶液のエルソン・マンガン反応およびエンヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(11) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3% 濃度水溶液)

(12) 構成糖および炭酸基、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、10,10-

およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

(13) 構成アミノ酸およびアミノ糖

加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、リジン、グルタミン酸、シロイソチオニン酸、グルコサミンおよびムラニン酸の存在を認める。

次の図面第5項記載の血管新生抑制剤。

2. 炭酸化多糖体 DS 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する抗腫瘍剤。

3. 発明の詳細を説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規な炭酸化多糖体 DS 4152 並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤に関する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、シクロホスファミド、AT-25 の腫瘍生物中に腫瘍溶解作用、免疫抑制作用およびインターフェロン誘起作用を有する炭酸化多糖体 DF 4639 が存在することが知られて

2. 炭酸化多糖体 DS 4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

1. リンパ管性肉腫、増殖性肉腫、癌、腫瘍性肉腫、未熟児肉腫に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4. 炭酸化多糖体 DS 4152 を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

5. 炭酸化多糖体 DS 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

6. ステロイドが糖質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類から選ばれたものである特許請求の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。

7. リンパ管性肉腫、増殖性肉腫、癌、腫瘍性肉腫、未熟児肉腫に有効な特許請求

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-25329号)。

本発明者らは、種々の有用性の期待される炭酸化多糖体 DF 4639 について生物学的特性を明らかにすべく検討をかねてつた結果、DF 4639 が強い発癌性を有することを知つた。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この発癌性物質を除去すべく、更に研究をかねてつていたところ、DF 4639 は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちの DS 4152 と名づけられた一成分は発癌性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用を有することを見出した。

更にまた、本発明者は、この DS 4152 とステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の知見に基くものであり、その目的は、腫瘍を促進化多量体 DS 4152 を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、促進化多量体 DS 4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、促進化多量体 DS 4152 とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本明細書中の「血管新生抑制」とは、癌の

発育、実体形成、創傷の治癒等に際して重要だけでなく、調節リユーマを含む慢性炎症、免疫応答、線癌増殖等の病的状態においてもその病体の進展に深く関与している血管の新生作用を抑えることをいう。したがって、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が関与する腫瘍、例えばリユーマ性関節炎、増殖性網膜炎、乾眼、糖尿病網膜炎、未熟児網膜症等の治療、予防に有用なものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の促進化多量体 DS 4152 は、アルスロパクター 99-AT-25 (工業技術院生

物工業技術研究所には、M107000000 99-AT-25 として、FERM P-5255 及び Arthrobocter 99-AT-25 として FERM BP-1357 の番号で登録されている) の培養物から分離される DF 4639 (特開昭 66-67301 号参照) から、その中に含まれる分子量の 1.8×10^4 以上の発癌性物質等を通常の分子重量分離法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法、アルコール沈澱法で除くことによつて得られる。

すなわち、ゲルろ過法によれば DF 4639 を通常のゲルろ過媒体、例えば、セファタリル (Sepharose 3-300 (ファルマシア製)) を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高速ゲルろ過クロマトグラフィ

(夏津ソーダ製 03000 SW カラム使用) を行い、排除限界 (ボイド・ボリューム、void volume) にピークを示すフラクション (B 画分) とボイド・ボリュームにピークを与えず分子量の $2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ の範囲に抽出されるフラクション (L 画分) を与え、透析する。

また、限外ろ過は通常の膜 (例えば Amicon 社製の YM10、YM30、XM50、PM30 や Millipore 社製の NOVA100、OMEGA100、NOVA50、OMEGA50 等特記 YM10) を用い、窒素ガスによる加圧またはペリステリフク (peristaltic) ポンプによつて加圧 (0.5 ~ 5 kg/cm² 程度) し、透過液を DS 4152 として採ればよい。使用溶媒は、水-エタ

特開昭63-119500(4)

ノール(10:2~3)または水が適量であり、4で乃至室温で行なうのが一般的である。

得られた各透析液を濃縮後ろ過し、ろ液を数倍量のエタノール中に沈降下注ぐことにより生成する白色沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥すれば、目的とするDS 4152(1面分)と発熱性物質(2面分)が各々得られる。

こうして得られるDS 4152は以下に述べる物理化学的諸性質を示す。下記の特性はそのナトリウム塩についてのものである。

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

20000±3000

(2) 元素分析値(300°Fの値を示す)

ルン、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(7) 着色反応

フェノール-硫酸、アンスロン-硫酸、ビュレット反応およびローリー・フォリン反応は陽性。水溶液のエルソン・マルガン反応およびエンヒドリン反応も陽性。カルベソール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8(3%炭酸水溶液)

(9) 構成糖および炭水化物、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、30%以上およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

N 0.51~0.89% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(10) 糖および蛋白質の含量

糖含量(%): 87±3(フェノール-硫酸法、ガラクトース還元)

蛋白含量(%): 1±0.5(ローリー・フォリン法、牛血清アルブミン標準)

(11) 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} -37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)

(12) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

1240, 840(肩), 810(cm^{-1} ; KBr)

(13) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム

(14) 構成アミノ酸およびアミノ酸

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイノシリン酸、グルコサミンおよびムン酸の存在を認める。

炭上のDS 4152は、後記実施例で示す如く、単独でも血管新生抑制作用を有するものであるが、ステロイド剤と組合せることにより、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤においては、DS 4152の代りにヘパリン、低分子ヘパリン等を使用することもできる。

従来、プレドニゾン、デキサメタゾン等のステロイドホルモンが、癌転移阻害、発熱阻、ハムスト

一疾患に実験的に誘導された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer Res. 39 1308 (1979) J. Hall, Cancer Inst. 57 769 (1976) 及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 1176 (1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、雄質コルチコイド(プレドニゾン、プレドニゾン、ベタメタゾン等)は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロステンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン等が乳癌腫瘍用として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている(Oncology 10 72 (1984))。

ゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート、フオスフェート、アテルアセテート、テトラヒドロフタレート、トリメチルアセテート等);メチルプレドニゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート等);ベタメタゾンおよびその誘導体(フオスフェート、バレレート等)が挙げられる。

また、グルコルコルチコイドのC-11位の水酸基が=配位になつた異性体(たとえば、11 α -エピヘイドロコルチゾン)も含まれるし、前記グルコルコルチコイドのテトラヒドロ代謝物(グルコルコルチコイド活性の有無は関係しない)も含まれる。

更に、黄体ホルモンであるプロゲステロン、

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体およびエストロゲン類が前立腺癌の治療に用いられている。

前記の08 4152 と組合せ用いることのできるステロイド類は、雄質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類等であり、より具体的に次のものが例示される。

(1) プレゲナンを母核とするステロイドホルモン、すなわちグルコルコルチコイドであり、たとえばコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、エナンテート、ワンダリレート等);ヘイドロコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート、カプロエート等);プレドニゾンおよびその誘導体;プレドニ

メドロキシプロゲステロンおよびその誘導体(アセテート等);ディドロゲステロンおよびその17 α -アセトキシ誘導体(デュフアストン)等が挙げられる。

更にまた、メナロコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンおよびその誘導体(アセテート、トリメチルアセテート、エナンテート、フエニルプロピオネート等)も挙げられる。

(2) アンドロステンを母核とするステロイドホルモン、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンおよびその誘導体(プロピオネート、エナンテート、アテレート、カプリレート等)が挙げられる。また、エピテストノールおよび

その誘導体、ヒドロコルチゾンがあげられる。
さらにフルオキシメステロンおよびその誘導体、メテラステロンおよびその誘導体、メテノロンおよびその誘導体も含まれる。

- (3) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、性腺ホルモンであり、たとえば、エストロンおよびその誘導体、エストラジオールおよびその誘導体（ベンゾエート、ジプロピオネート、バレレート、ウンデセノエート等）、エストラジオールおよびその誘導体（トリプロピオネート等）があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の剤型としては、有効成分を医学的に許容される媒体、賦形剤を含有する種々の形態、例えば水または各種の塩液用剤に溶解させた液剤、散剤、錠剤

である。注射による投与の場合は通常経口の1/5量が適量である。

また、本発明の血管新生抑制剤を抗癌剤として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

(発明の効果)

本発明の DS 4152 はそれ単独でもつても血管新生抑制作用を有するが、これを更にステロイド剤と配合せるとより優れた血管新生抑制作用を有する。

したがって、DS 4152 単独でもつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と配合させたものは相乗的に作用が増強されるので、例えば腫瘍血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として得

られ、散剤、錠剤、注射剤、坐剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤が DS 4152 とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記剤型の単剤に調製して配合せ用とすることも、あるいは両成分を混合剤とし調剤化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、静脈内、おぼろ内、経口、皮下、直腸内、粘膜内または患部局所内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、DS 4152 として1~2000mg程度であり、ステロイド類は男性ホルモン剤、副腎コルチコイド剤で10~1000mg、通常30~60mgが適量で、調製していくのが好ましいことがある。プロゲステロン剤では100~1200mgが適

に有用なものである。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1(A)

特開昭56-67301号に記載の方法により得られた DS 4639 (50%) を1.5mlの0.1M NiCl_2 に溶解し、これを0.1M NiCl_2 で平衡化したカラム（セファクリルS-300:50×80cm）にかけて同速度にて抽出し、1.8mlずつ抽出液を集めた。得られたフラクションについて高速ゲル浸透クロマトグラフィー（東洋ソーダ製 83000 SWカラム、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5）を行い、ポリ・ビニルアルコールにピークを与えず、

特開昭63-119500(7)

分子量(ゲラトラン標準)が約 2×10^4 ~ 8×10^4 の範囲に抽出されるフラクションを集め(約700ml)、脱イオン水に対して透析した。透析内液を約50mlまで濃縮後ろ過した。ろ液を約400mlのエタノール中へ投下し、生成した沈殿を集め、これを90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(50℃、6時間)して目的物のDS 4152の白色粉末3.8gを得た。

一方、上記高濃アルブミンクロマトグラフィーでピーク・ポリマーにピークを与えるフラクションを集め(約90ml)、上述のDS 4152の場合と同様に処理して、E成分を白色粉末として0.18g得た。

(b) ガラクトース、グルコース、炭水素および糖の組成モル比

試体を1規定塩酸中100℃で5時間加水分解しイオン交換樹脂で脱塩処理した後、常法によりアルジトールアセテートとしてガスクロマトグラフィーで分析した。また、炭水素および糖のモル比は、SおよびPの含量(%)から算出した。

表2

	ガラクトース	グルコース	炭水素	糖
DS 4152	6.1	1.0	7.3	0.6
DP 4639	6.2	1.0	7.3	0.6
E成分	6.2	1.0	6.9	0.6

表2は、グルコースを1.0モルとした場

DS 4152の物理化学的性質および生物学的性質をDP 4639およびそのE成分と比較して示す。

(c) 糖、蛋白、SおよびP含量(表1)

表1

	1) 糖(%)	2) S(%)	3) 蛋白(%)	4) P(%)
DS 4152	56	1.11	1.1	0.66
DP 4639	54	1.08	1.3	0.66
E成分	42	0.79	0.6	0.72

1) フェノール-炭酸法(ガラクトース換算)

2) アントノビラスの方法(C.A. Antonescu, Acta Chem. Scand. 16, 1521 (1962))による

3) ローリー・フォリン法(牛血清アルブミン換算)

4) チエンらの方法(P.S. Chen et al., Anal. Chem. 28, 1756 (1956))による。

各成分のモル比の1例である。

(d) 組成アミノ酸およびアミノ糖の同定

DS 4152を3規定塩酸中、100℃16時間加水分解した後、常法によりアミノ酸分析にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイソノビリン酸、グルコサミンおよびムラミン等のピークを認め、

(e) 比旋光度: $(\alpha)_D^{20}$ (c=0.5, 水)

表3

	比旋光度
DS 4152	-37
DP 4639	-36
E成分	-34

(f) ゲルろ過層出パターン

表1図、表2図および表3図に、それぞれ

特開463-119500 (日)

あると推定される。

(1) 発熱性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行つた発熱性試験の結果を第4表に示す。

以下空白

DS 4152、DF 4639 及びH部分の高濃ゲル透過クロマトグラムを示す(東洋ソーダ 3000 1号カラム使用、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5、0.9ml/分、標準物質デキストランT-10 及び T-40)。

(1) 紫外吸収スペクトル

2mg/ml水溶液において220~340nmに最大吸収は認められない。

(2) 赤外線吸収スペクトル (KBr錠)

1240、840(肩) 及び810 cm^{-1} K、炭化多環に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主としてD-ガラクトースとD-グルコースから成る糖質部分にムライン酸フェosphateを介してメチルグリカン部の結合した炭化多環体で

第4表

試 体	用 量 mg/10ml	体積上昇量					
		個別	計	+	+	+	+
DS 4152	75	0.20	0.10	0.15	0.45		
	375	0.20	0.50	0.20	0.90		
DF 4639	15	1.55	1.25	1.40	4.20		
	75	1.40	2.00	1.60	5.20		
	15	1.90	1.40	2.20	5.50		
H部分	75	1.60	1.75	2.65	6.20		

・+ (陽性)、- (陰性)

(1) DS 4152 の急性毒性(マウス、静注)は、LD₅₀が2000mg/kg以上であった。

実施例1(例)

DF 4639 (20g)を300mlの水-エタノール(10:3)溶液に溶解し、YM10膜(41.8 cm^2 、アicon社製)を用いて、真空で加圧(1.5kg/ cm^2)下、室温で限外ろ過した。上記ろ液を逐次しながら透過液量が約3Lとなるまで実施した。透過液の濃縮液(約50ml)に100mgの酢酸ナトリウムを加えて溶解した後、過心分離により得られる上清を約500mlのエタノール中へ投下し下した。生成した沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(55℃、3時間)してDS 4152

0白色粉末337を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す如く、
蛋白、S及びPの含量を除き、実施例1(A)の
DS 4152 と同一であつた。

糖含量 58%
S含量 11.3%
蛋白含量 0.9%
P含量 0.92%

高速ゲル透過クロマトグラムを第4図に示
す(0.3000 Mカラム、0.1 M酢酸ナトリ
ウム緩衝液(pH 6.5)、0.8 ml/分)。

実施例2

局所性尿管新生阻止試験(直接法)：

局所を用い、ナイターとフォーケマン

(Nature 207:307,(1962))の方法を—

べた。ステロイドとしては、局所コルチゾン
を0.5 mg/局所の量(尿管新生に影響のない
量)を用いた。また、比較として、DP 4639
及びE面分についてもその活性を調べた。こ
の結果を第5表に示す。

第5表

50%尿管新生阻止量(ID₅₀値)

	DS 4152	DP 4639	E面分
ID ₅₀ 値 (mg/局所)	3	30	600

実施例4

実施例2と同様な方法で、各種ステロイド
とDS 4152 の併用によるID₅₀値の変化を檢
討した。この結果、種々のステロイドに10

特開昭63-119500 (9)

面改良した以下の方法で行つた。

局(ノーランクロス)の4~6日経受後局
の尿管部に、生理食塩水で溶解したDS 4152
又はヘパリンを添加し、37℃で培養した。

高糖添加2日後に、尿管部血管の発達度を
生理食塩水のみを添加した対照と比較し、ア
ロビット法により、50%尿管新生阻止量
(ID₅₀値)を算出した。

この結果、本発明のDS 4152 のID₅₀値
は、160 mgでもつた。これに対し、ヘパ
リンは、100 mgでも作用を示さなかつた。

実施例3

局所性尿管新生阻止試験(直接法)：

実施例2と同様な方法で、ステロイドと

DS 4152 を併用した場合の効果について調

べた。DS 4152 を加えれば、それぞれの局
所性尿管新生阻止活性が16~100倍
に増加することが明らかとなつた(第6表)。

第6表

ステロイド	ID ₅₀ 値(mg/局所)	
	単 独	DS 4152 (増加) と併用 (倍率)
コルチゾンアセテート	120	017 (71倍)
ハイドロコルチゾン	110	016 (69)
プレドニゾン	130	008 (163)
6α-メチルプレドニゾン	115	003 (383)
ベタメタゾン	080	005 (160)
テトラヒドロ8	100	001 (1000)
プロゲステロン	102	049 (21)
17β-エストラジオール	112	042 (27)
17β-エストラジオール	106	028 (70)
フルオキシメステロン	124	012 (103)
5α-アンドロステロン	252	029 (8)

特開昭63-119500 (10)

この結果から明らかなように、用量依存的な血管新生抑制作用が認められた。

実施例6

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

実施例5と同様に、ステロイドと DS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン を5mg/kgの割合で用い、DS 4152 は300mg/kg又は3000mg/kgとなるよう調整して加えた。また、比較として OF 4639 及び E 画分を用いた。この結果を図8に示す。なお、表中の数値は、生理食塩水を同量投与した対照マウスより採取した血液を添加した尿原血管の発達度を100%とした時の阻止率である。

実施例5

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR系雄マウスに皮下もしくは経口で投与し、6時間後に血液を採取した。0.313%タエン酸ナトリウムで凝固を阻止し、直滴法と同様に5日経受精母尿原尿に添加し、2日後に判定した。この結果を図7に示す。

図7表

投与ルート	投与量 (mg/kg)	血管新生阻止率 (%)
経口	3	59
	30	264
	300	627
皮下	3	16
	30	378
	300	661

図8表

投与ルート	DS 4152	OF 4639	E 画分
皮下	922%	833%	868%
経口	927%	868%	828%

DS 4152 及び OF 4639 は経口、皮下いずれの経路によっても尿原血管新生を抑制することが認められた。

実施例7

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

ICR系雄マウスに、生理食塩水に溶解した DS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に溶解して経口または筋肉内投与した。投与6時間後に採血し、0.313%タエン

酸ナトリウムで凝固を阻止し、これを直滴法と同様に5日経受精母尿原尿に加え、2日後に血管新生に及ぼす効果を確認した。結果は、同量の生理食塩水のみの投与したマウス、6時間経過後の血液を加えた場合の尿原血管の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。この結果を図9の通りである。

以下余白

表10A

物質名 (ルート)	投与量 (mg/kg)	DS 4152投与量 (mg/kg, p.o.)	癌発生阻止率 (%)
コナソノブチレート (p.o.)	0	0	27
		30	75.1
チトラヒドマス (p.o.)	1	0	-26
		30	71.7
	0	0	-123
		30	80.7
	0	0	40
		30	52
エビタスノール (i.m.)	50	0	15.4
		30	23.4
	100	0	24.2
		30	27.6

実施例8

試験方法:

C57BL/6雄マウスに同系の卵巣由英収水腫瘍MS076を 1×10^6 個皮下接種し、5日目よりDS 4152を30mg/kg/日1回週6回皮下投与したところ、著大な抗腫瘍効果と生存日数の有意な延長が認められた。すなわち第10表に示すように移植21日目の腫瘍平均重量は対照群の37% (63%抑制) であり、かつノディアン生存日数が対照群より33%延長した。

腫瘍平均重量は、腫瘍塊の長軸と短軸の長さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{腫瘍平均重量} = (\text{長軸}) \times (\text{短軸})^2 \times \frac{1}{2}$$

実施例9

試験方法:

ICR系雄マウス (5週齢) にチルコマ160 (8160) を 1×10^6 個皮下接種し、3日目より酢酸コナソンの生理食塩水懸濁液を250mg/kg/日8回割合で3日間、100mg/kg/日8回割合で1日投与した。

DS 4152は生理食塩水に溶解し、0.61もしくは0.1mg/マウスとなる液1日1回皮下もしくは腹腔にて4日間投与した。移植7日目に屠殺して腫瘍重量を対照と比較したところ第11表に示す如く酢酸コナソンのみを投与した群では腫瘍重量は生理食塩水投与群と差がなかったが、さらにDS 4152を投与することにより腫瘍増殖阻止作用が得ら

表10A

腫瘍系	群	投与量 (mg/kg)	腫瘍重量 (mg)	抑制率 (%)
MS076	対照群	0	230±0.14 (100)	0
	DS 4152投与群	30	149±0.09 (37)	33

(a) 移植21日目の平均腫瘍重量±標準偏差、(b) は平均重量の割合。

(c) (a) 腫瘍重量のノディアン生存日数/対照群のノディアン生存日数 $\times 100$

れ、打錠後の減量率の60～175%であった。

表11 例

処 方	減 量 率	
	平均値±標準偏差	T/C%
生理食塩水(90)	Q361± Q191	1000
生理食塩水(90)	Q391± Q122	1000
酢酸コルチゾン	Q340± Q162	942
0.5 4152 (Q61mg/..... 90)	Q361± Q070	1000
0.5 4152 (Q1mg/..... 90)	Q261± Q077	723
0.5 4152 (Q61mg/..... 90) +酢酸コルチゾン	Q063± Q016	175*
0.5 4152 (Q1mg/..... 90) +酢酸コルチゾン	Q028± Q011	74*
0.5 4152 (Q61mg/..... 90)	Q322± Q071	824
0.5 4152 (Q1mg/..... 90)	Q356± Q115	908
0.5 4152 (Q61mg/..... 90) +酢酸コルチゾン	Q063± Q036	161**
0.5 4152 (Q1mg/..... 90) +酢酸コルチゾン	Q036± Q016	69**

* P<0.05, ** P<0.01 ステューデントt-検定による

減量し注射剤とする。

実施例12

投 用:

0.5 4152 6mg、プレドニゾン20mg、乳糖30mg、トクモロコシゲンチン135mg、カルボキシメチルセルロースカルシウム5mg、ヒドロキシプロピルセルロース3mg及びステアリン酸マグネシウム0.5mgを常法に従って混合、打錠し、1錠とする。

4. 図面の簡単な説明

第1図をいし第4図は高速ゲル透過クロマトグラムである。

以 上

実施例10

製 剤:

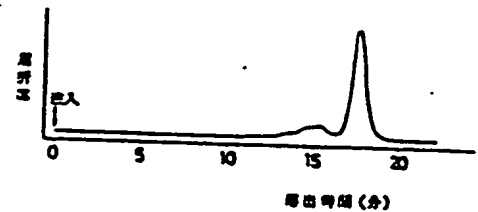
0.5 4152 6mg、乳糖300mg、トクモロコシゲンチン144mg、カルボキシメチルセルロースカルシウム30mg及びヒドロキシプロピルセルロース30mgを用い、常法に従って300mgの錠剤を調製した。この錠剤は錠状に溶かして1850.0mg～5mgを服用する。

実施例11

注 射 剤:

0.5 4152 12mg、塩化ナトリウム90mgを注射用蒸留水に溶解し、10mlとする。この溶液をメンブランフィルターでろ過した後、アンプルに充填し、115℃で30分間

第1図



第2図

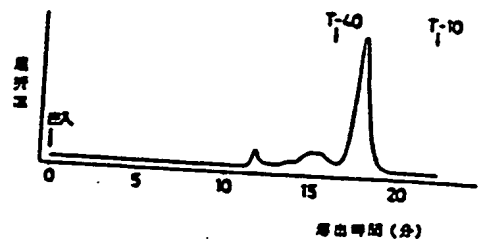


図 3

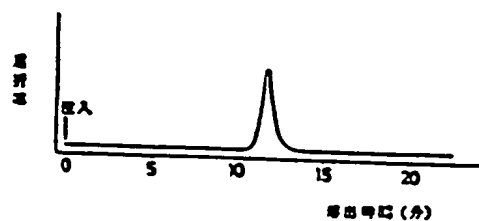
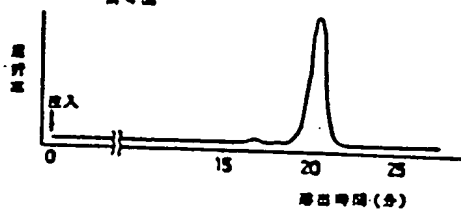


図 4



第 1 頁の続き

④ Int. Cl. 8

A 61 K 31/723
37/02
C 08 B 37/08
C 12 P 19/04
// (A 61 K 31/723
31:56)

識別記号

ADU
ABE

庁内整理番号

8615-4C
6779-4C
C-8515-4B
7252-4C

発明者 小 河

秀 正

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究
所内